

# 苹果酒融合子综合性能的酵母优选研究

赵志华<sup>1</sup>, 岳田利<sup>1,\*</sup>, 王燕妮<sup>2</sup>, 袁亚宏<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌

712100 2. 山东凤祥集团总公司, 山东 阳谷

252325)

**摘 要:** 采用原生质体融合技术构建的增香型苹果酒酵母融合子 P6、W1、W12、W38 和 3# 菌株, 全面研究了其发酵性能、抗逆性、凝聚性和海藻糖积累能力等性能指标, 并得到了一株优良的苹果酒酵母融合子, 为优质苹果酒的酿造和高品质专用苹果酒活性干酵母(*Alcohol-fermentation Active Dry Yeast*, AADY)的研究和开发提供了理论依据。

**关键词:** 苹果酒; 酵母融合子; 性能; 优选

## Optimization Study on Yeast Based Comprehensive Performance of Cider Yeast Fusant

ZHAO Zhi-hua<sup>1</sup>, YUE Tian-li<sup>1,\*</sup>, WANG Yan-ni<sup>2</sup>, YUAN Ya-hong<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

2. Shandong Fengxiang Group General Company, Liaocheng 252325, China)

**Abstract:** Using the yeasty fusant P6, W1, W12, W38 with aroma-improving capability of protoplast fusion with yeast strain 3#, comprehensive and complete performance studies, such as fermentation capability, stress resistance, flocculent property and high accumulation of trehalose were carried out. A fusant strain with excellent performance is obtained. The results will offer certain theoretical foundation for researching and developing the high quality cider and AADY.

**Key words:** cider; yeasty fusant; performance; optimization

中图分类号: TQ92

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0227-05

优良的苹果酒酵母是制备高品质苹果酒 AADY 和生产高质量苹果酒的保证, 对转化我国丰富的苹果资源, 增加农产品的附加值<sup>[1]</sup>, 促进酵母产业和现代苹果酒工业的持续发展, 具有重要的意义。但目前缺乏苹果酒专用酵母, AADY 也面临如何在利用真空冷冻干燥和流化床干燥等高新技术干燥时, 使制品保持高存活率和良好的发酵特性的瓶颈。本研究

在利用原生质体融合技术构建的苹果酒融合子基础上, 对融合子的渗透压耐性、乙醇耐性、SO<sub>2</sub> 耐性等抗逆性、凝聚性、发酵力及海藻糖积累能力进行了全面的考察, 最终获得具有良好的发酵特性、抗逆性等综合性能突出的酵母, 并高积累具有抗逆性作用机制的海藻糖<sup>[2]</sup>, 从而为优良苹果酒及专用苹果酒 AADY 的研发奠定基础。

收稿日期 2006-06-23

\*通讯作者

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA501A5-2.3); 国家西部专项(2001BA901A19); 霍英东基金项目(81065)

作者简介: 赵志华(1978-), 男, 硕士研究生, 主要从事食品生物工程新技术研究。

- [3] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 1-3.
- [4] OZER F, KARAKAYA S, UNLU N, et al. Comparison of antibacterial activity of two dentin bonding systems using agar well technique and tooth cavity model[J]. Journal of Dentistry, 2003, 31: 111-116.
- [5] AWADH A N A, JULICH W D, KUSNICK C, et al. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2001, 74: 173-179.
- [6] 吴向阳, 仰榴青, 陈钧, 等. 银杏外种皮中银杏酸抗植物病原真菌活

- 性研究[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2003, 13(5): 389-393.
- [7] 陈坚, 李寅. 发酵过程优化原理与实践[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [8] 陈坚, 堵国成, 李寅, 等. 发酵工程实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003(5): 272-312.
- [9] MURAT E, FERDA M. A kinetic model for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. Process Biochemistry, 1999, 34: 625-631.
- [10] 陈洪章. 生物过程工程与设备[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 27-31.

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

苹果酒酵母菌株 西北农林科技大学食品学院生物反应器实验室通过原生质体融合构建得到的苹果酒酵母融合子 P6、W1、W12 和 W38；3# 酵母菌 轻工部发酵研究所。苹果为采自陕西洛川的优级红富士 (Red Fuji)，在本学院发酵动力学实验室进行榨汁护色。海藻糖积累培养基 葡萄糖 4%，蛋白胨 2%，酵母膏 1%， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%， $\text{MgSO}_4$  0.1%，pH6.0。

### 1.2 仪器与设备

UV-2550 双光束紫外分光光度计 日本岛津公司；HWY-2112 超低温摇床 上海智城分析仪器制造有限公司；RM180R 高速冷冻离心机 美国 SIM 公司；ES-315 自动杀菌锅 日本 TOMY 公司；HS-600D 超声波清洗机 宁波市北仑桦升超声波机械厂；WYT 手持糖度计 泉州中友光学仪器公司；ZDJ-4A 自动电位滴定仪 上海精密仪器科学；SH/T0093 砂芯超滤装置 江苏建湖长城仪器制造。

### 1.3 测定方法

发酵速率采用  $\text{CO}_2$  失重法；酒精度采用酒精计法；总糖采用直接滴定法测定；总酸采用电位滴定法测定<sup>[3]</sup>；胞内海藻糖的测量采用硫酸-蒽酮法<sup>[4]</sup>。

### 1.4 抗逆性试验

用蔗糖调整苹果汁中的糖度，得到糖度分别为 220、240、260、280 和 300 g/L 的发酵液，以进行耐高渗试验；把无水乙醇加入含糖 150 g/L 的苹果汁中，得到 11%、12%、13%、14% 和 15% (V/V) 等五个乙醇浓度，以进行耐乙醇试验；在含糖 150 g/L 的苹果汁中加入  $\text{NaHSO}_3$ ，使有效  $\text{SO}_2$  含量分别为 100、150、200、250 和 300 mg/L，以进行耐  $\text{SO}_2$  试验；用 DL-苹果酸调整含糖 150 g/L 的苹果汁，使其酸度分别为 8、10、12、14 和 16 g/L，以进行耐酸试验；把酵母菌种子液在无菌条件下分装成两份，一份在冰箱 ( $5 \pm 1$ ) °C 冷藏，另一份在 -20°C 冷冻 4h 后，在 30°C 融化 10min，接种到含糖 150 g/L 的发酵苹果汁中以进行耐冷冻试验；把调整后的发酵液按 100ml 的装液量分装于 250ml 三角瓶，按接入酵母菌种子液，在 20°C 下恒温厌氧发酵 5d，每 12h 测量一次  $\text{CO}_2$  失重情况，5 d 后测定残糖。同时做空白试验。

### 1.5 凝絮性测试<sup>[5]</sup>

### 1.6 生物生长量试验

将含糖 150 g/L、pH4.14 的灭菌冷却后的苹果汁，按 100ml 的装液量分装于 250ml 三角瓶，接 5% 的接种量 ( $10^7$  CFU/ml)，分别置于 26、28、30 和 32°C 下恒温培养。在对数生长期，利用平板计活菌数法测定 12h 内的细胞数，按照 (1) 计算出 12h 内酵母菌的平均比生

长速率。

$$\mu = \frac{1}{t} \ln \frac{x}{x_0} = \frac{1}{12} \ln \frac{x}{x_0} \quad (1)$$

式 (1) 中， $\mu$  为酵母平均比生长速率，1/h； $x_0$  为对数期开始时的细胞浓度； $x$  为对数期 12h 后的细胞浓度。

### 1.7 苹果酒酿造试验

将酵母菌种子液接种到含糖量 210 g/L、pH4.14 的苹果汁发酵培养基中，在 20°C 下恒温厌氧发酵 17d，每天测一次  $\text{CO}_2$  失重量，并在发酵结束后测定酒精度、残糖和总酸。

### 1.8 海藻糖积累试验

将酵母菌种子液接 5% 的接种量 ( $10^7$  CFU/ml)，接种到海藻糖积累培养基中，120r/min 摇瓶培养 36h 后，用冰蒸水洗涤离心三次，再用 0.22  $\mu\text{m}$  的膜进行超滤，称取 0.5g 鲜酵母用硫酸-蒽酮法测定胞内海藻糖积累量。

## 2 结果与分析

### 2.1 酵母菌的抗逆性

试验菌株经过三级培养得到种子液，菌液浓度均达到  $10^7$  CFU/ml，在培养 2~4h 时都进入对数期，14~16h 进入稳定期，可按 5% 的接种量接种，进行各项试验。

#### 2.1.1 渗透压耐性

合适的葡萄糖浓度会促进酵母菌的生长和发酵，高浓度的葡萄糖会对酵母产生抑制作用<sup>[6]</sup>。从试验结果来看，五株酵母菌在较低糖度的情况下，都表现出较高的渗透压耐性，但当糖度添加到 300 g/L 时，如图 1 (图中“B”表示空白试验，下同)，3# 酵母菌表现出明显的不耐性。

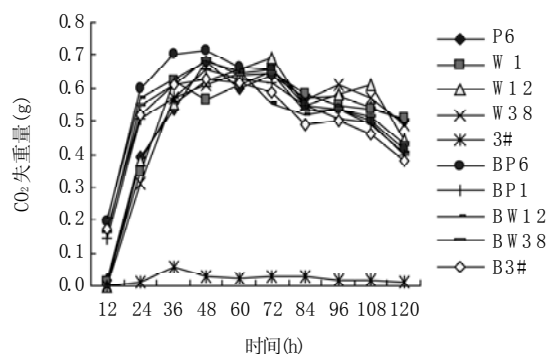


图1 五株酵母菌对糖度(300g/L)的耐受性

Fig.1 Ferment capability of five strains at 300 g/L sucrose media respectively

#### 2.1.2 乙醇耐性

酵母的生长速率、存活性和发酵速率不同，酿酒酵母的乙醇耐性也有差异，而对发酵能力的抑制强弱是

酒精耐性最好的指示剂<sup>[7]</sup>,乙醇对酵母发酵的抑制效应随乙醇浓度的增加而加剧,因此,酿酒酵母产酒精能力取决于菌株的乙醇耐受性。试验酵母菌五株酵母菌对乙醇表现出明显的不耐性,在11%(V/V)的乙醇浓度下,仅有微弱的起酵,见图2。在12%、13%、14%和15%的乙醇浓度下,试验酵母菌几乎不发酵。

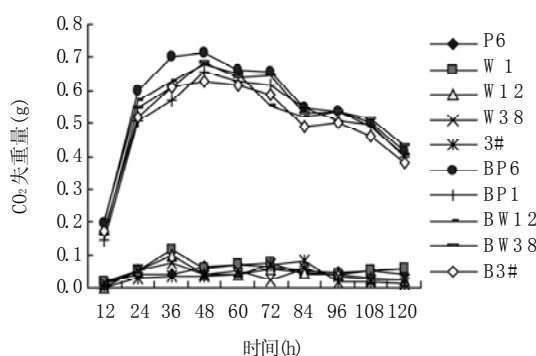


图2 五株酵母菌对乙醇(11%)的耐受性

Fig.2 Ferment capability of five strains at 11% alcohol media respectively

### 2.1.3 SO<sub>2</sub> 耐性

SO<sub>2</sub>在果酒酿造中起杀菌、增酸、抗氧化、澄清果汁和护色作用,大部分可在发酵过程中逐渐消失,正常添加量一般为50~100mg/L左右。试验菌株都表现出良好的SO<sub>2</sub>耐性,即使在SO<sub>2</sub>添加量达300mg/L时,W1、3#仍表现出较高的SO<sub>2</sub>耐受能力,但与对照组相比,大约在60h和72h时才开始起酵。

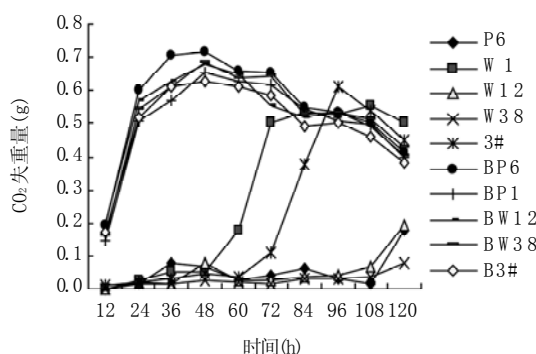


图3 五株酵母菌对SO<sub>2</sub>(300mg/L)的耐受性

Fig.3 Ferment capability of five strains at 300 mg/L SO<sub>2</sub> media respectively

### 2.1.4 苹果酸耐性

酵母在高酸保持较高的发酵速率,有利于减少发酵中杂菌的污染,试验酵母菌株对苹果酸均表现出良好的耐性,即使在16g/L的高酸环境中(见图4),P6、W1、W38和3#都表现出良好的发酵性能。

### 2.1.5 冷冻耐性

试验酵母菌经-20℃冷冻处理4h后,其发酵性能

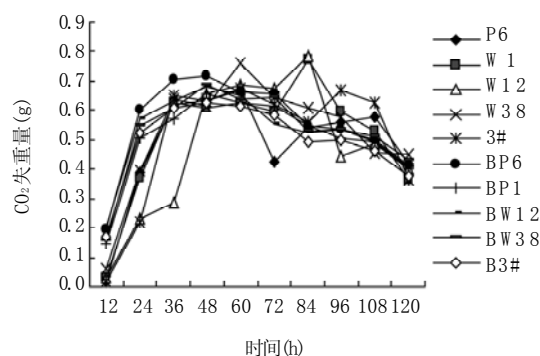


图4 五株酵母菌对苹果酸(16g/L)的耐受性

Fig.4 Ferment capability of five strains at 16 g/L malic acid media respectively

较对照组均有所降低,但幅度不大(见图5),说明冷冻耐性突出。

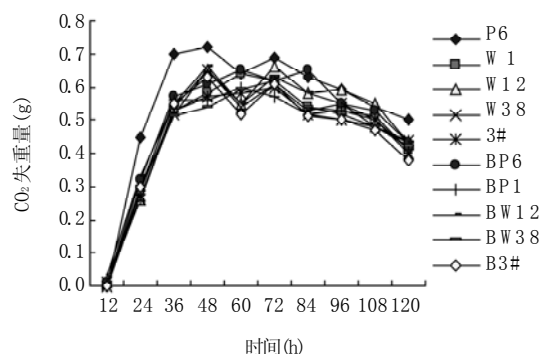


图5 五株酵母菌对冷冻(-20℃)的耐受性

Fig.5 Ferment capability of five strains under frozen at -20℃ respectively

### 2.2 凝聚性测试

酵母菌的凝聚性有利于果酒酿造工艺的优化,改善果酒的风味,便于对果酒进行分离,它是筛选优良苹果酒酵母的一项重要指标。试验苹果酒酵母的本斯值都大于1(见图6),凝聚性良好,是典型的絮凝酵母。

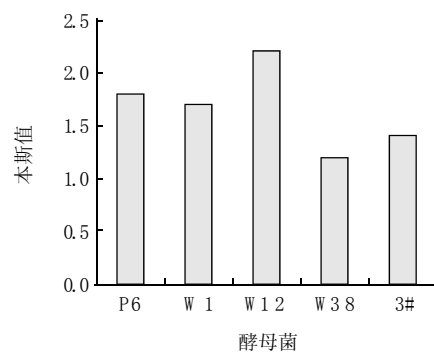


图6 五株酵母菌的絮凝性

Fig.6 Comparison of flocculent property of five strains

### 2.3 生物生长量测试

试验酵母菌株在 26、28、30 和 32℃ 下恒温培养, 比生长速率不同, 由图 7 表明 P6、W12 和 3# 的最适培养温度为 28℃, W1 和 W38 的最适培养温度分别为 32℃ 和 30℃, 菌株 W1 的耐温性能最好。

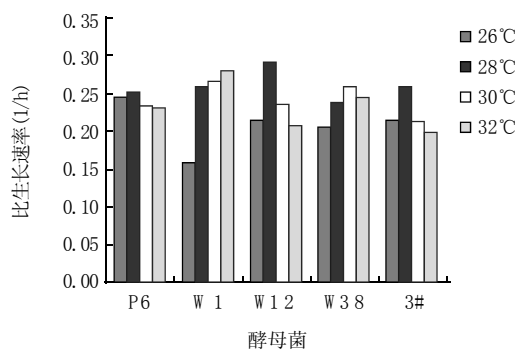


图 7 五株酵母菌在不同温度下的生长情况

Fig.7 Growth of five strains in different temperatures

## 2.4 苹果酒醇造试验

经过 17d 的发酵, 五株酵母菌的残糖量均小于 4g/L, 酒精度均大于 12%, 表明试验菌株均具有高发酵力, W1 达到最高 12.9%, 源菌株 3# 最低为 12.4%。

表 1 五株酵母的主要发酵指标  
Table 1 Mail ferment indexes of five strains

	P6	W 1	W 1 2	W 3 8	3#
酒度(%)	12.8	12.9	12.7	12.7	12.4
残糖(g/L)	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4
酸度(g/L)	3.67	4.02	4.03	3.91	4.10

## 2.5 酵母菌的海藻糖积累试验

海藻糖是典型的应激代谢物, 具有生物胁迫保护特性, 能特异性地稳定细胞内生物膜、蛋白质、核酸等生物大分子结构, 细胞内海藻糖的含量是鉴定 AADY 质量和活性的一个重要指标, 增加胞内海藻糖的积累量, 能增强酿酒酵母的抗逆性<sup>[8]</sup>。根据测定结果, 五株酵母菌都具有较好的海藻糖积累能力, W1 的海藻糖积累量达 11.53%(干基), P6、W12 和 W38 的海藻糖积累量分别为: 10.33%、10.63% 和 10.66%, 源菌株 3# 积累量最低, 仅 7.15%。

由试验结果知五株酵母菌都具有优越的抗逆性、发酵特性、高海藻糖积累能力、耐温特性和絮凝性, 但综合比较, 菌株 W1 较源菌株的优势更为突出, 其降糖快, 产酒精度高(12.9%), 海藻糖积累量高(11.53%), 耐高渗(300g/L)、耐乙醇(11%)、耐 SO<sub>2</sub>(300g/L)、耐酸(16g/L)、耐冷冻(-20℃), 耐温性能好(32℃), 比生长速率和凝聚性都保持较高的水平。

## 2.6 优良苹果酒酵母菌评价结果的验证

为了定量比较各株酵母在高渗透压、酸、乙醇、

SO<sub>2</sub>、高温等不良条件下的发酵能力, 通过(2)可计算出各菌株的发酵抑制比, 发酵抑制比数值越小, 表明该菌在不良环境下的发酵能力越强, 经计算, 各菌株在耐性条件下的发酵抑制比如表 2, 从结果来看, 酵母菌 W1 的发酵抑制比较低, 与上面分析得到的结论是一致的。

$$R = \frac{C' - C}{C_0 - C} \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中, R 为发酵抑制比(%); C、C' 为正常条件、耐性条件下发酵后发酵液中的残糖浓度(g/L); C<sub>0</sub> 为发酵液中的初始糖浓度(g/L)。

表 2 五株酵母在胁迫条件下的发酵能力比较(%)

Table 2 Comparison of ferment capabilities of five different strains under stress conditions (%)

		P6	W 1	W 1 2	W 3 8	3#
耐高渗	220g/L	5.18	5.73	6.77	5.15	5.47
	240g/L	6.70	8.98	9.76	10.18	10.78
	260g/L	9.07	9.92	11.97	11.88	11.88
	280g/L	9.46	10.42	12.35	12.95	18.66
	300g/L	12.72	12.56	13.22	12.74	95.87
耐乙醇	11%	75.1	66.71	68.3	68.92	73.32
	12%	71.79	78.01	69.34	77.55	73.52
	13%	77.82	78.75	76.65	82.53	76.83
	14%	91.76	82.16	82.56	84.1	79.07
	15%	94.65	83.27	91.01	86.38	84.45
耐 SO <sub>2</sub>	100mg/L	0.16	0.34	1.61	0.90	1.33
	150mg/L	1.97	3.12	3.34	4.28	3.93
	200mg/L	4.00	4.11	5.89	13.69	9.85
	250mg/L	6.88	11.15	8.98	29.03	13.56
	300mg/L	51.13	18.00	51.7	52.22	18.75
耐酸	8g/L	0.03	0.05	0.3	0.15	0.34
	10g/L	0.14	0.22	0.42	0.16	1.25
	12g/L	0.79	0.77	0.55	0.44	1.29
	14g/L	2.13	2.82	4.85	1.06	4.22
	16g/L	4.19	3.37	11.23	3.94	13.05
耐冷冻	-20℃	2.78	3.19	3.59	4.09	4.34

## 3 结论与讨论

优良的酿酒酵母能发酵得到高品质的苹果酒, 并可避免发酵过程中杂菌的污染, 减少酒体的氧化。由本实验结果可知, W1 酵母菌相对其它四株各项性能指标都较高, 具有良好的耐性、凝聚性和较高的比生长速率, 发酵速率也很理想, 把发酵得到的苹果原酒经陈酿、超滤、冷冻后, 对其进行感官品评, 苹果酒体浅黄带绿, 具有新鲜悦人的果香和浓郁的酒香, 口味纯正柔和, 酸甜适口, 风格典型。因此, 综合各项性能, W1 酵母是适合酿造苹果酒的最优菌种, 加之具有高海藻糖积累的特性, 对苹果酒和苹果酒专用 AADY 的开发和生产具有重要的意义。

# 纳豆菌原生质体制备与再生条件的研究

刘新梅<sup>1,2</sup>, 高 宇<sup>3</sup>, 赵 静<sup>1</sup>, 李冰冰<sup>1</sup>, 刘 朔<sup>1</sup>, 董明盛<sup>1,\*</sup>

(1. 南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095

2. 南京市产品质量监督检验所, 江苏 南京 210028 3. 南京理工大学科技处, 江苏 南京 210094)

**摘 要:** 研究了菌体培养时间、溶菌酶作用条件(酶作用温度、浓度和时间)对纳豆菌BNK菌株原生质体制备和再生的影响。在此基础上, 考察了不同再生培养基、渗透压稳定剂及原生质体保护剂对再生率的影响。确定了菌株BNK原生质体制备和再生最佳条件为: 菌体培养9h收集, 0.8mg/ml溶菌酶, 30℃作用40min制备原生质体, 将原生质体涂布于以甘露醇为渗透压稳定剂、添加有淀粉的PYG培养基中再生, 此时原生质体制备率达98.2%, 再生率为28.4%。

**关键词:** 纳豆菌; 原生质体制备; 再生

Study on Conditions for Protoplast Production and Regeneration of *Bacillus subtilis natto*

LIU Xin-mei<sup>1,2</sup>, GAO Yu<sup>3</sup>, ZHAO Jing<sup>1</sup>, LI Bing-bing<sup>1</sup>, LIU Shuo<sup>1</sup>, DONG Ming-sheng<sup>1,\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2. Nanjing Inspection and Testing Institute of Products Quality, Nanjing 210028, China

3. Department of Science and Technology, Nanjing Science and Technology University, Nanjing 210094, China)

**Abstract:** The effects of natto strain BNK cultivation time, operational times, temperature and concentration of lysozyme on protoplast production and regeneration were studied. In addition, different operational methods, regeneration media, osmotic stabilizers and protective additives were also investigated. The appropriate conditions of culture are 9 h, BNK treated by 0.8 mg/ml lysozyme for 40 min at 30 °C, then spreaded on PYG medium with mannitol as stabilizer and starch as a protector. Under these conditions the protoplast formation achieves 98.2% and regeneration frequency 28.4%.

**Key words** *Bacillus subtilis natto* protoplast preparation; regeneration

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0231-06

众所周知, 纳豆丰富的营养价值和多种医疗保健功能与纳豆菌的发酵作用密切相关。纳豆菌能发酵大豆产生纳豆激酶、抗菌物质、维生素、异黄酮、皂

甙等多种生物活性成分, 使发酵制品具备溶血栓、抗菌、降血压、抗癌、预防骨质疏松等多种医疗保健功能<sup>[1-2]</sup>。

收稿日期: 2006-06-22

\*通讯作者

基金项目: 国家“863”计划项目(2002AA248041); 江苏高新技术研究项目(BG2002322)

作者简介: 刘新梅(1979-), 女, 助理工程师, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物与生物技术。

## 参考文献:

- [1] 王晓茹, 王颖. 苹果酒酿造工艺及高级醇的气相色谱分析[J]. 中国食品学报, 2006, 6(1): 351-355.
- [2] GANCEDO C, FLORES C L. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi [J]. FEMS Yeast Research, 2004(4): 351-359.
- [3] GB/T 15038-1994 葡萄酒、果酒通用分析方法[S].
- [4] 程书梅, 王昌禄, 顾金兰, 等. 海藻糖对耐盐酵母的影响[J]. 中国酿

造, 2005(8): 8-9.

- [5] 杜连祥. 工业微生物实验技术[M]. 天津: 科技出版社, 1992: 137-138.
- [6] 张伟, 毛志群, 马雯, 等. 高产酒精酵母SP-48的耐性生理研究[J]. 酿酒, 2004, 31(1): 37-39.
- [7] 王滨, 张国政, 路福平, 等. 酵母酒精耐性机制的研究进展[J]. 天津轻工业学院学报, 2001(1): 18-21.
- [8] ARANDA J S, SALGADO E, TAILLANDIER P. Trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells: experimental data and structured modeling[J]. Biochemical Engineering, 2004, 17: 129-140.